

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 3 日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/077031 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/745, G01N 33/86, C07K
1/22, A61K 38/36, 38/48, A61P 7/02, 43/00

(74) 代理人: 八田 幹雄, 外(HATTA, Mikio et al.); 〒102-
0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレ
ス二番町 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/02594

(22) 国際出願日: 2002 年 3 月 19 日 (19.03.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-79469 2001 年 3 月 19 日 (19.03.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤森工
業株式会社 (FUJIMORI KOGYO CO., LTD.) [JP/JP];
〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番
16号 Tokyo (JP). チッソ株式会社 (CHISSO CORPO-
RATION) [JP/JP]; 〒530-0005 大阪府大阪市北区中之
島三丁目6番32号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 細川 和也
(HOSOKAWA, Kazuya) [JP/JP]; 〒221-0842 神奈川県
横浜市 神奈川区泉町6-1 中央ビル黒川502号
室 Kanagawa (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: THROMBIN DERIVATIVES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, ANHYDROTHROMBIN DERIVA-
TIVES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, PLATELET AGGLUTINATION-INDUCING COMPOSITIONS,
METHOD OF INDUCING PLATELET AGGLUTINATION, CLINICAL TEST REAGENTS, CLINICAL TEST METHOD,
THROMBOSIS INHIBITORS, ADSORBENT AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME,

(54) 発明の名称: トロンビン誘導体およびその製造方法、アンヒドロロンビン誘導体及びその製造方法、血小板凝
集惹起組成物、血小板凝集惹起方法、臨床検査薬、臨床検査方法、血栓形成抑制剤、吸着体およびその製造方法、
精製された血液凝固第VIII因子の製造方法

(57) Abstract: Thrombin derivatives having a lowered fibrinogen activity and anhydrothrombin derivatives having a lowered fibrino-
gen activity are provided. Namely, thrombin derivatives wherein carboxyl of thrombin is modified; and anhydrothrombin derivatives
wherein carboxyl of anhydrothrombin is modified. Because of having a lowered affinity for fibrinogen, these thrombin derivatives
are usable as platelet agglutination-inducing compositions and specific coagulation reaction reagents for clinical tests, etc. By affin-
ity chromatography with the use of anhydrothrombin as a ligand bonded to carboxyl, blood coagulation factor VIII can be more
selectively purified. The anhydrothrombin derivatives having modified carboxyl exert a sufficient antithrombotic effect in a smaller
amount than conventional anhydrothrombin does, which makes them usable as thrombosis inhibitors.

[続葉有]



WO 02/077031 A1



(57) 要約:

フィブリンノーゲン活性を低下させたトロンビン誘導体およびその製造方法、ならびにフィブリンノーゲン活性を低下させたアンヒドロトロンビン誘導体及びその製造方法を提供する。本発明は、トロンビンのカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体；およびアンヒドロトロンビンのカルボキシル基が修飾されたアンヒドロトロンビン誘導体を提供するものである。該トロンビン誘導体は、フィブリンノーゲンに対する親和性が低下しているため、血小板凝集惹起組成物として、さらには臨床検査用などに特異的な凝固反応試薬として利用できる。また、アンヒドロトロンビンを取りガンドとし、カルボキシル基と結合させたアフィニティークロマトグラフィーにより、血液凝固第VIII因子に対してより選択性の高い精製が可能となり、また、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾したアンヒドロトロンビン誘導体は、従来のアンヒドロトロンビンに比べ少量で十分な抗血栓効果を生じるため、血栓形成抑制剤として利用できる。

明 細 書

トロンビン誘導体およびその製造方法、アンヒドロトロンビン誘導体及びその製造方法、血小板凝集惹起組成物、血小板凝集惹起方法、臨床検査薬、臨床検査方法、血栓形成抑制剤、吸着体およびその製造方法、精製された血液凝固第 VIII 因子の製造方法

技術分野

本発明は、トロンビン誘導体およびその製造方法、アンヒドロトロンビン誘導体およびその製造方法、当該トロンビン誘導体を用いた血小板凝集惹起組成物、血小板凝集惹起方法、臨床検査薬および臨床検査方法、当該アンヒドロトロンビン誘導体を用いた血栓形成抑制剤、吸着体およびその製造方法、および当該吸着体を用いて精製された血液凝固第 VII I 因子の製造方法に関する。

.5

背景技術

近年、血栓形成防止物質を合成する方法として、特開平 1 1 - 4 9 8 0 0 号公報に記載されているセリンプロテアーゼである活性化血液凝固因子にフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)などの阻害剤と反応させて活性部位に存在するセリン残基をデヒドロアラニンに転換し、セリンプロテアーゼ活性を失わせて基質との結合能のみを維持させる方法(アンヒドロ化と称する)、あるいは遺伝子組換え操作によってセリンプロテアーゼ活性を消失させる方法が開発されている。これらの方法を用いてトロンビン进行处理することにより得られたアンヒドロトロンビンは、活性化血液凝固因子と基質との反応を競争的に阻害する効果を持ち、トロンビン基質(活性化血液凝固因子、フィブリノーゲンなど)の

15

吸着体のリガンドとしての利用や、血栓形成抑制剤としての利用が期待されている。

しかしながら、このアンヒドロトロンピンは化学処理や遺伝子操作によってセリンプロテアーゼ活性を失わせたのみで基質の結合能に関して

5 は未処理のトロンピンと基本的に変わらないため、アンヒドロトロンピンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーでトロンピンの基質（血液凝固第 V、第 VIII、第 XI、第 XIII 因子、フィブリノーゲン、

プロテイン C など）の混在する血漿などの液から血液凝固第 VIII 因子

0 ンピンは抗血栓剤としての機能は有するものの、前述した抗血栓剤同等の抗血栓効果を示すためには使用量が多く必要であり、その使用が限られていた。

また、血小板機能異常の診断において、血小板凝集能の測定は必須であり、トロンピンは血小板凝集惹起物質として測定に使用されているが、

5 トロンピンは血小板の凝集以外にもフィブリノーゲンの活性化も誘起するため、フィブリンの凝集塊が血小板凝集能の測定に悪影響を及ぼす問題があった。

したがって、本発明の目的は、活性化血液凝固因子であるトロンピン、又はトロンピンをアンヒドロ化したアンヒドロトロンピンに関して、化学的、又は遺伝子操作による修飾によりトロンピン基質（血液凝固第 V

0 III 因子）の選択性を向上させたトロンピンまたはアンヒドロトロンピン誘導体、及びトロンピン誘導体を成分として含む血小板凝集惹起物質及び臨床検査薬、及びこのアンヒドロトロンピンをリガンドとした吸着体、またアンヒドロトロンピン誘導体を主成分とし、抗血栓性能を向上

5 させた血栓形成抑制剤を提供することである。

発明の開示

本発明者は、トロンビンに関して鋭意研究を重ねた結果、トロンビンのカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体は、トロンビン基質のうちフィブリノーゲンの親和性を選択的に低下させる、即ち、フィブリノーゲンからフィブリンへの変換を阻害して、血小板のみを特異的に活性化することを見出した。

また、本発明者は、さらにアンヒドロトロンビンに関して鋭意研究を重ねた結果、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾したアンヒドロトロンビン誘導体は、相対的に血液凝固第 VIII 因子に対する特異的選択性が向上すること、抗血栓性が向上することを知得した。これらの知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明は、下記の (1) ~ (14) の構成からなる。

- (1) トロンビンのカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体。
- (2) アンヒドロトロンビンのカルボキシル基が修飾されたアンヒドロトロンビン誘導体。
- (3) トロンビンのカルボキシル基を修飾することを特徴とする前記トロンビン誘導体の製造方法。
- (4) アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾することを特徴とする前記アンヒドロトロンビン誘導体の製造方法。
- (5) 前記 (1) に記載のトロンビン誘導体を含む血小板凝集惹起組成物。
- (6) 前記 (1) に記載のトロンビン誘導体を用いることを特徴とする血小板凝集惹起方法。
- (7) 前記 (1) に記載のトロンビン誘導体を含有することを特徴とする臨床検査薬。
- (8) 前記 (1) に記載のトロンビン誘導体を用いることを特徴と

する臨床検査方法。

(9) 前記(2)に記載のアンヒドロトロンビン誘導体を含有する血栓形成抑制剤。

(10) アンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体であって、該結合が、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基と不溶性担体の官能基との反応によるものである吸着体。

(11) アミノ基を2以上有する化合物のアミノ基とアンヒドロトロンビンのカルボキシル基との結合によってアミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンと、水不溶性担体とが結合してなる吸着体であって、
1) 該結合が、該アミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンが含有するアミノ基と不溶性担体の官能基との反応によるものである吸着体。

(12) アンヒドロトロンビンのカルボキシル基と不溶性担体の官能基とを反応させることを特徴とするアンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体の製造方法。

5 (13) アミノ基を2以上含有する化合物のアミノ基とアンヒドロトロンビンのカルボキシル基との結合によってアミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンが有するアミノ基と、不溶性担体の官能基とを反応させることを特徴とするアンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体の製造方法。

0 (14) 前記(10)または(11)に記載の吸着体を用いることを特徴とする精製された血液凝固第VIII因子の製造方法。

図面の簡単な説明

第1図は、全血におけるトロンボエラストグラム(TEG)である。

15 第2図は、実施例8において、10 μ lトロンビン添加後の血小板凝集の変化(吸光度の変化)を示すグラフである。

第3図は、実施例8において、 $100\mu\text{l}$ EDC修飾トロンビン添加後の血小板凝集の変化（吸光度の変化）を示すグラフである。

第4図は、実施例8において、 $10\mu\text{l}$ EDC修飾トロンビン添加後の血小板凝集の変化（吸光度の変化）を示すグラフである。

第5図は、実施例9で得た修飾トロンビンによるフィブリノーゲンに対する凝固活性とアミノ基（アミン）量を示すグラフである。

第6図は、実施例10において、各濃度のEDC修飾トロンビン添加後の血小板凝集の変化（吸光度の変化）を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

第一の態様によると、本発明は、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾したトロンビンまたはアンヒドロトロンビン誘導体を提供するものである。

本発明で修飾の対象となるアンヒドロトロンビンの製造方法は特に限定されるものではなく、アンヒドロトロンビンとしては、例えば、特開平11-49800号公報に示されているように、セリンプロテアーゼのセリン活性残基部位とPMSFなどの阻害剤とを反応させた後、pH 11以上でアルカリ処理を施し、アンヒドロ化して得られたもの、また、遺伝子組換えなどの手法でトロンビンの活性セリン残基をアラニンに置き換え酵素活性を消失させる方法で得られたものが挙げられる。

アンヒドロトロンビンの精製方法は特に制限されるものではなく、従来公知の精製分離方法を利用する事が出来る。具体的には、pH 4~10の範囲で調整された緩衝液（セリンプロテアーゼのアンヒドロ化反応の際に用いられた緩衝液をそのまま使用してもよい）を使用して平衡化されたアフィニティークロマトグラフィーカラムにアンヒドロトロンビ

ンの溶液を通液してクロマトグラフィー担体にアンヒドロトロンピンを選択的に吸着させたのち洗浄し、他の不純物を除去する方法がある。

その後、アフィニティークロマトグラフィー担体に結合したアンヒドロトロンピンを脱離する目的で、セリンプロテアーゼ阻害剤溶液、あるいはアミジノ基、グアニジル基、フェニル基、長鎖アルキル基、アルギニン残基のうち少なくとも1つ以上を有する物質溶液をpH 4~10に調整し、アフィニティークラムに通液し、目的物質を溶出させる。その後、透析、限外濾過、ゲル濾過などの手法により前述の脱離液成分を除去し、高純度のアンヒドロトロンピンを得る事が出来る。

- 1) 本発明のアンヒドロトロンピンの精製に利用する事が可能なセリンプロテアーゼ阻害剤としては、フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF)、2-フェニルエタン-1-スルホニルフルオリド、メタンスルホニルフルオリド、及びp-トルエンスルホニル(トシル)フルオリドなどの各種スルホニルフルオリド、さらに、トシルクロリド、
- 5 ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP)、3,4-ジクロロイソクマリン (3,4-DCI)、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸 (TLCK)、及びL-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-4-フェニル-2-ブタノン (TPCK) などを挙げる事ができる。
- 0 上記のようにして得られたアンヒドロトロンピン、またはトロンピンの有するカルボキシル基を修飾し、トロンピン、またはアンヒドロトロンピン誘導体を得る。ここでいう修飾とは、トロンピン、またはアンヒドロトロンピンの有するカルボキシル基の一部または全ての修飾を意味し、その修飾方法としては、イミド結合またはアミド結合であることが
- 15 好ましく、例えば、トロンピン、またはアンヒドロトロンピンの有するカルボキシル基の一部または全てをイミドと結合させる方法；トロンピ

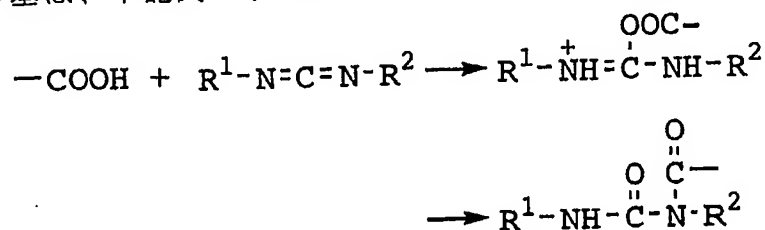
ン、またはアンヒドロトロンビンの有するカルボキシル基の一部または全てをアミノ基を有する物質と結合させる方法；およびトロンビン、またはアンヒドロトロンビンの有するカルボキシル基の一部または全てをイミド及びアミノ基を有する物質と結合させて、当該カルボキシル基を修飾する方法がある。アミノ基を有する物質としては、化合物、天然由来の物質など特に限定はないが、カルボキシル基周辺の立体的嵩を増すものがより好ましい。また、これらの反応の方法については従来既知の方法を用いることができる。

- 前記に使用されるイミドは、特に制限されないが、カルボジイミド誘導体、より好ましくは式： $R^1N=C=NR^2$ で示されるカルボジイミド誘導体が好ましく使用される。上記式において、 R^1 及び R^2 は、メチル基、エチル基、シクロヘキシル基等の炭素原子数1～15の鎖状または環状アルキル基、(2-モルホリノエチル)-p-トルエンメトスルホン酸塩、(3-ジメチルアミノプロピル)塩酸塩などを表わす。この際、 R^1 及び R^2 は、同一であってもあるいは異なるものであってもよい。より具体的には、カルボジイミド誘導体としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド（以下「DCC」と記載する） $[C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11}]$ 、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド {N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride} $[CH_3CH_2-N=C=N-(C_6H_2)_3N^+H(CH_3)_2Cl^-]$ （以下「EDC」と記載する）、及びN-シクロヘキシル-N'-2-(4'-メチル-モルフォリニウム)エチルカルボジイミド-p-トルエンスルフォネート {N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpholinium)ethyl carbodiimide-p-toluene sulfonate}（以下「CMC」と記載する）などが挙げられる。これらのカルボジイミド誘導体は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の

形態で使用されてもよい。これらのうち、水溶性カルボジイミドである EDC 及び CMC が特に好ましく使用される。

- 本発明において、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基のイミドによる修飾条件は、使用されるアンヒドロトロンビンや修飾物質（イミド）の種類や量、ならびに他の条件などによって異なり、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基を所望の程度にまで修飾できる条件であれば特に制限されない。トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基の修飾に好ましい一実施態様を以下に記載する。すなわち、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンをまず適当な pH の緩衝液で透析した後、修飾物質を添加し、0～50℃、好ましくは 4～25℃、特に好ましくは室温で、0.5～24 時間、好ましくは 1～7 時間、攪拌する。この際、使用できる緩衝液としては、pH 3～9、好ましくは pH 4～7 を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、ピペ
5 ス緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール－塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液などを挙げるができる。また、修飾物質の添加量は、トロンビンまた
0 はアンヒドロトロンビンのカルボキシル基を所望の程度にまで修飾できる量であれば特に制限されないが、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンに対して過剰に存在することが好ましく、例えば、上記緩衝液中に 0.01M～5 M、より好ましくは 0.1～2 M 程度の濃度で存在することが好ましい。
- 5 なお本発明において、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基のイミド（カルボジイミド誘導体）による修飾によって、カ

ルボキシル基は、下記式に示されるように修飾されると考えられる。



本発明において、トロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基の修飾は、アミノ基を有する物質を用いて行なわれてもよい。このようなアミノ基を有する物質による修飾によって、トロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）がアミド（ $-\text{CO}-\text{NHR}$ ）に変換する。この際、トロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基の修飾は、アミノ基を有する物質単独を用いて行なわれても良いが、アミノ基を有する物質及びイミドを組合わせて使用して行なわれることが好ましい。後者の場合、トロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基をイミドで修飾した後に、またはトロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基のイミドによる修飾工程中に同時に加えてもよい。

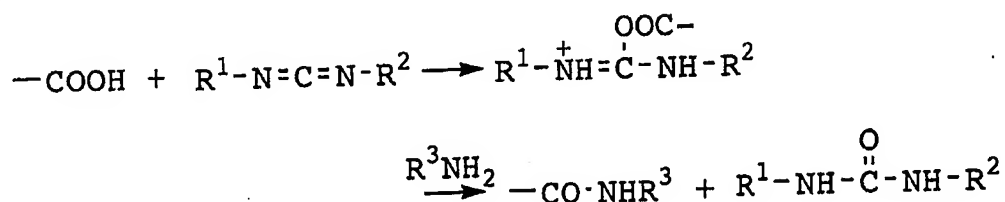
本発明で使用されるアミノ基を有する物質は、トロンピンまたはアンヒドロトロンピンのカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）がアミド（ $-\text{CO}-\text{NHR}$ ）に変換するものであれば、化合物、天然由来の物質など特に限定はないが、カルボキシル基周辺の立体的嵩を増すものがより好ましい。アミノ基を有する物質の具体例としては、エチレンジアミン、トリスヒドロキシアミノメチル、ヒドロキシアミン、エタノールアミン、塩化アンモニウムなどが挙げられる。これらのうち、エチレンジアミン、トリスヒドロキシアミノメチルが好ましい。また、これらの反応の方法については従来既知の方法を用いることができる。アミノ基を有する物質は、単独で使用されてもあるいは2種以上の混合物の形態で使用されてもよ

い。

本発明において、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基のイミド及びアミノ基を有する物質による修飾条件は、使用されるアンヒドロトロンビンや修飾物質（イミド及びアミノ基を有する物質）の種類や量、ならびに他の条件などによって異なり、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基を所望の程度にまで修飾できる条件であれば特に制限されない。トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基の修飾に好ましい一実施態様を以下に記載する。すなわち、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンをまず適当なpHの緩衝液で透析して夾雑物を除去した後、修飾物質を添加し、0～50℃、好ましくは4～25℃、特に好ましくは室温で、0.5～24時間、好ましくは1～7時間、攪拌する。この際、使用できる緩衝液としては、pH3～9、好ましくはpH4～7を示す緩衝液から任意に選ばれたものを加えたものであれば良い。こうした緩衝液としては、例えば、ピペ
ス緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝
液、クエン酸－リン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸－水酸化ナトリウム
緩衝液、フタル酸カリウム－水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾール
塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液あるいはグッドの緩衝液な
どを挙げることができる。また、イミド及びアミノ基を有する物質の添
0 加量は、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基を所
望の程度にまで修飾できる量であれば特に制限されないが、イミドの添
加量は、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンに対して過剰に存在す
ることが好ましく、例えば、上記緩衝液中に0.01～5M、より好ま
しくは0.1～2Mであることが好ましい。また、アミノ基を有する物
5 質の添加量は、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンに対して過剰に
存在することが好ましく、例えば、上記緩衝液中に0.1M～5M、よ

り好ましくは0.5～2Mであることが好ましい。

なお、本発明において、トロンビンまたはアンヒドロトロンビンのカルボキシル基のイミド（カルボジイミド誘導体）及びアミノ基を有する物質による修飾によって、カルボキシル基は、下記式に示されるように修飾され则认为られる。



本発明において、上記のトロンビン誘導体は、トロンビンのカルボキシル基の一部または全てをイミドと結合させることにより、またはトロンビンをイミド及びアミノ基を有する化合物と結合させることにより、フィブリノーゲンとの親和性を選択的に低下させたものであり、フィブリノーゲンからフィブリンへの変換を阻害して、血小板のみを特異的に活性化することを特徴とする。このため、本発明のトロンビン誘導体は、血小板凝集惹起物質として、さらには、臨床検査薬、特に血小板の正常性をモニターするための検査薬として有用である。

また、本発明において、上記のアンヒドロトロンビン誘導体は、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基の一部または全てをイミドと結合させることにより、またはアンヒドロトロンビンをイミド及びアミノ基を有する化合物と結合させることにより、血液凝固第VIII因子を含む血液凝固因子や血小板などへの何等かの作用あるいは影響によって血液凝固第VIII因子に対する向上した選択的親和性を有する；および抗血栓性が改善されることを特徴とする。このため、本発明のアンヒドロトロンビン誘導体は、吸着体、特に血液凝固第VIII因子の精製用の吸着体に；および血栓形成抑制剤、特に血液凝固第VIII因子に特異的な血栓

形成抑制剤として有用である。

第二の態様によると、本発明は、トロンビンのカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体を成分とする血小板凝集惹起物質及び臨床検査薬である。本発明のトロンビン誘導体はフィブリノーゲンの親和性を修飾により低下させており、トロンビンによるフィブリン形成を押さえることが可能なため、フィブリン析出による影響を受けず、血小板凝集作用のみを特異的に生じさせることが可能である。また、この特質を生かし、血栓症などにおける臨床検査用の試薬として使用できる。

第三の態様によると、本発明は、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾したアンヒドロトロンビン誘導体を含有する血栓形成抑制剤を提供するものである。臨床で、血液凝固を抑制すべき病体は多く、その時の状態に応じて血栓形成抑制剤を投与する必要があるが、本発明の血栓形成抑制剤は生理的な物質由来であり、従来のアンヒドロトロンビンを含む血栓形成抑制剤と比較してより少量で血液凝固抑制効果を示すため、安全性、コスト面からも好ましい。

第四の態様によると、本発明はアンヒドロトロンビンのカルボキシル基と水不溶性担体上の官能基を結合してなる吸着体を提供するものである。

本発明に使用される担体としては、公知の担体を使用できるが、水不溶性担体が好ましく使用される。本明細書において、「水不溶性担体」ということばは、担体を構成する成分が非水溶性、または水溶性の物質を架橋反応などの処理を行うことにより水不溶性とした物質からなる担体を意味する。具体的には架橋アガロース、セルロース、キトサン、及びポリアクリルアミドなどが挙げられ、これらのうち、セルロース及び架橋アガロースが担体として好ましく使用される。また、該水不溶性担体の形状は、特に制限されず、公知の形状が使用されるが、例えば、球

状粒子状、中空糸状および膜状などの形状が挙げられる。

本発明において、水不溶性担体が球状粒子である場合には、その形状は正確に真球である必要はないものの、真球度の高いものであることが好ましい。具体的には、球状粒子の真球度が0.9以上、より好ましくは0.95以上であることが好ましい。なお、本明細書において、「真球度」とは、粒子の最小径（短径）に対する最大径（長径）の比（＝短径／長径）であり、ゆえにこの値が1.0に近づくほど真球度が高い、即ち、真球に近くなることを意味する。

また、本発明において、水不溶性担体の形状が球状である場合、この水不溶性担体は球状セルロースであることが好ましい。このように水不溶性担体として球状セルロースを使用することによって、リガンドであるアンヒドロトロンビンの固定化が容易であり、アンヒドロトロンビンをリガンドして含む活性化血液凝固第VIII因子吸着体は、生体適合性及び強度とも高くなる。このため、本発明の吸着体は、活性化および/または非活性化血液凝固第VIII因子の吸着体として有効である。なお、ここで示される「生体適合性」ということばは、担体を吸着体担体として用いて精製操作を行う際に、担体から生体に有害な物質の溶出が生じないということを意味する。

本発明において、水不溶性担体の形状が中空糸状である場合における中空糸状の担体とは、内部に連続または不連続の空洞を有する繊維状の担体を意味し、例えば、紡糸液に発泡剤を添加することにより、または特殊な口金などを用いて内部に空洞を形成する事により得られる。

さらに、本発明において、水不溶性担体の形状が膜状である場合における膜状の担体としては、市販のメンブランフィルターのように平板状で多孔を有し、一定の範囲の排除限界分子量を持つものがある。

本発明において、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を水不溶性

担体に固定する方法としては、従来既知の方法が使用できるが、例示すると水溶性カルボジイミドである EDC や、CMC を用い、水不溶性担体上のアミノ基と結合させる方法、または、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基と EDC、あるいは CMC を結合させた後、エチレンジアミンなどの複数のアミノ基を有する化合物と縮合させた後、導入されたアミノ基と水不溶性担体上の N-ヒドロキシサクシンイミド (N-hydroxysuccinimide) (以下、「NHS」と称する。)とを結合させる方法などがある。結合の方法としては NHS 結合担体を用いての結合が過剰活性基のブロッキングの際にリガンドであるアンヒドロトロンビンの有するアミノ基に影響を与えないため、より好ましい。

水不溶性担体とリガンドの間に挿入するスペーサーに関しては特に限定はなく、エポキシ基、ホルミル基などを有する公知の化合物で適度の長さを持つものを適宜選択することができる。

第五の態様によると、本発明は、第四の態様の活性化凝固第 VIII 因子吸着体を使用する活性化血液凝固第 VIII 因子の製造方法を提供するものである。この方法を使用することによって、他のトロンビン基質であるフィブリノーゲンや、活性化血液凝固第 V 因子をほとんど吸着せず、活性化血液凝固第 VIII 因子を選択的に吸着することができ、また免疫原となる物質や異種蛋白やウイルスなどの混入の可能性も有意に低く抑

1) さえることができる。

本発明の活性化血液凝固第 VIII 因子の製造方法としては、本発明の第四の態様である活性化凝固第 VIII 因子吸着体をカラムに充填し、他の血液凝固因子などの含まれた血漿成分、あるいは夾雑物として異種蛋白やウイルスなどが混入している血漿などの溶液中から活性化血液凝固

5) 第 VIII 因子を選択的に吸着し、高度に回収、あるいは除去を行う方法である。

実施例

以下、本発明の実施例により具体的に説明する。

実施例1：アンヒドロトロンビンの合成

人血漿由来トロンビン60mgを0.15MのNaCl、0.1%PEGを含む50mMリン酸緩衝液(pH6.5)100mlに溶解した。この溶液に7%PMSFメタノール溶液100 μ lを、30分間隔で3回添加した。反応の間溶液の温度を25 $^{\circ}$ Cに保った。反応後のトロンビン活性は1%以下であった。PMS-トロンビン溶液を0.1M NaCl、0.1%PEGを含む10mMリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化したセファデックス(Sephadex) G-25カラム(ファルマシア社製)に注入し緩衝液の交換を行った。

上記溶液を4 $^{\circ}$ C、120mlに調整し終濃度0.05Mになるように1N NaOHを添加し12分反応を行なった。得られた溶液に対し3; N NaCl 60mlを添加し、次いで150ml グリセリンを添加攪拌した。上記溶液を10倍量の1M NaCl、0.1%PEGを含む10mMリン酸緩衝液(pH6.5)に透析後、再度0.1M NaCl、0.1%PEGを含む10mMリン酸緩衝液(pH6.5)に透析した。

0 実施例2：アンヒドロトロンビンの精製

実施例1で得られたアンヒドロトロンビン溶液をバイオマックス10(ミリポア社)によって50mlに濃縮し、30mg p-アミジノフェニルメタンスルフォニルフルオリド(APMSF)を添加し残存活性を不活性化した。

5 さらに得られた溶液を0.1%PEGを含む5mMリン酸緩衝液でpH6.5に平衡化したベンズアミジンセファロースカラムに添加した。

ピークが終わるまで同緩衝液で洗浄し、0.1M NaClを含む0.2Mベンズアミジン(pH6.5)により溶出し、20mlずつ60mlを分取した。それぞれの蛋白量を測定し、アンヒドロトロンビンの含まれるフラクションを確認し、このフラクションを0.1M NaClを含む50mMリン酸緩衝液(pH6.5)で透析し、溶液中のベンズアミジンを取り除いた。この溶液中の蛋白量は30mg(収率50%)であった。

実施例3：アンヒドロトロンビンの修飾

実施例2で得られたアンヒドロトロンビン30mgをpH6に調整した20mM ビセスバッファー、0.5M NaClに透析した。透析後30mlに調整し20mg/mlになるようにEDCを加え攪拌した。室温で3時間反応し、アンヒドロトロンビン誘導体としてEDC修飾アンヒドロトロンビン30mgを得た。

実施例4：アンヒドロトロンビン結合アフィニティークロマトグラフィーの製造

実施例2で得られたアンヒドロトロンビン30mgをpH6に調整した20mM ビセスバッファー 0.5M NaCl 10ml中に透析し、アミノセルロファイン(チッソ社)20mlに添加した。再びpHを6に調整し 20mg/mlになるようにEDCを添加し6時間室温で反応させた。

実施例5

実施例4で得られたセルロースゲルをカラムに充填し50mM ビセスバッファー 0.1M NaCl pH6.5で平衡化した。同バッファーに溶解したコンファクトF(化血研)を添加し同バッファーで非吸着ピークを洗浄した。さらに混入するフィブリノーゲンを50mM ビセスバッファー 0.3M NaCl pH6.5で洗浄後50mM

ピベスバッファー 0.1M NaCl 1M アルギニン塩酸塩
pH 6.5で血液凝固第VIII因子を溶出した。混入するフィブリノー
ゲンを除去し約非活性1000u/mg 血液凝固第VIII因子が回収
された。

実施例 6

実施例 3 で得られた誘導体を添加し全血のトロンボエラストグラム
(TEG)を測定し、その結果を第1図に示す。その結果、第1図に示
されるように、本発明のEDC修飾アンヒドロトロンピンは、濃度依存
的に凝固を延長した。

実施例 7

人血漿に対し実施例 3 のアンヒドロトロンピン誘導体 (EDC修飾ア
ンヒドロトロンピン) を添加し、APTT (活性化部分トロンボプラス
チン時間) (表1)、PT (プロトロンビン時間) (表2) を測定した。

表 1

	各添加濃度における血漿凝固時間		
	無添加	0.1mg/ml	0.2mg/ml
EDC 修飾アンヒドロトロンピン	42.5 秒	115 秒	>180 秒
アンヒドロトロンピン	42.5 秒	45 秒	50 秒

表 2

	各添加濃度における血漿凝固時間		
	無添加	0.1mg/ml	0.2mg/ml
EDC 修飾アンヒドロトロンピン	24 秒	26 秒	31 秒
アンヒドロトロンピン	24 秒	25 秒	28 秒

上記表 1 及び 2 に示される結果から、本発明のアンヒドロトロンビン誘導体である EDC 修飾アンヒドロトロンビンは、APTT に特異的な濃度依存的な血漿凝固時間の延長が確認された。この際、APTT は内因系凝固に関連し、PT は外因系凝固に関連することを考え合わせると、本発明のアンヒドロトロンビン誘導体である EDC 修飾アンヒドロトロンビンは、外因系ではなく内因系凝固に関与して凝固時間を延長し、これから血栓形成抑制剤として有用であることが示唆される。さらに、上記実施例 5 及び下記実施例 11 から、本発明のアンヒドロトロンビン誘導体は、血液凝固第 VIII 因子に特異的に結合することから、特に血液凝固第 VIII 因子に特異的な血栓形成抑制剤として有用であることが示唆される。

実施例 8

人トロンビン 4 mg を 50 mM ビセスバッファー 0.1 M NaCl pH 6.5 4 ml に溶解し 100 mg EDC を添加し 3 時間反応し、トロンビン誘導体として EDC 修飾トロンビンを得た。血小板数 40 万/ μ l に調整した人多血小板血漿 (PRP) を用い上記物質を惹起物質として血小板凝集を測定した。凝集は吸光度の低下をモニターした (凝集メータアグリテック TE-500 使用)。PRP 240 μ l に対して、惹起物質としての EDC 修飾トロンビン 10 μ l 及び 100 μ l を、それぞれ、添加した。比較として 10 μ M のトロンビンを用いた。

第 2 図、第 3 図及び第 4 図は、それぞれ、10 μ l トロンビン、100 μ l EDC 修飾トロンビン、10 μ l EDC 修飾トロンビン添加後の血小板凝集の変化 (吸光度の変化) を示すグラフである。第 2 図、第 3 図及び第 4 図から、EDC 修飾トロンビンを用いることによって、比較対照としてのトロンビンを用いた場合に比較して、ノイズの少ない

モニターが可能であることが分かった。

- より詳しくのべると、トロンピンは、血栓形成の惹起物質であり、従来、血小板の正常性をモニターするための血小板活性化物質の一である。しかしながら、第2図に示されるように、トロンピンを用いた場合には、モニター中にノイズがかなり生じることが分かる。このようなノイズは、トロンピンは、血小板の活性化のみでなく、フィブリノーゲンからフィブリンへの変換をも引き起こすために生じると考えられ、ゆえに、血小板の正常性のみを選択的にモニターするためには、トロンピンからフィブリノーゲンを除去する必要がある。これに対して、本発明のトロンピン誘導体であるEDC修飾トロンピンは、第3図及び第4図から示されるように、モニター中のノイズがほとんど生じずに、即ち、フィブリノーゲンからフィブリンへの変換をも引き起こさずに、血小板のみを特異的に活性化できることが示される。したがって、血小板の正常性のモニターにおいて、フィブリノーゲンを除去する必要があると考えられる。
- 5 なお、以下の考察によって本発明が限定されるものではないが、本発明のトロンピン誘導体によるフィブリノーゲンからフィブリンへの変換の抑制（または阻害）は、トロンピン誘導体が、トロンピンのカルボキシル基の修飾により、トロンピンによるフィブリノーゲンの活性化部位を修飾することによると考えられる。
- 10 これから、本発明のトロンピン誘導体は、血小板凝集惹起物質として、さらには、臨床検査薬、特に血小板の正常性をモニターするための検査薬として有用であると考えられる。

実施例9

(i) : エチレンジアミン修飾トロンピンの調製

- 25 トロンピンをヘパリンカラムに添加して吸着させ、1 mM ビセスバッファー、0.5 M NaCl、pH 6.5にて溶出した。得られたト

ロンビン含有溶液 (0.6 mg/ml) に同量のエチレンジアミンを含む溶液 (1 M エチレンジアミン - 1 mM PIPES - 0.5 M NaCl pH 6.5) を混合した。次いで、これに最終濃度 20 mg/ml となるように EDC を添加し、EDC の添加から、2 時間にわたり、室温で攪拌し、縮合反応を行わせ、カルボジイミド添加時 (反応 0 分時) から 1、15、30、60、90、120 分後に試料の一部を採取した。

(ii): エチレンジアミン修飾トロンビンのフィブリノーゲンに対する凝固活性

上記反応 0 分時、1 分時、15 分時、30 分時、60 分時、90 分時、120 分時の試料に、同量のバッファー (50 mM NaHCO_3 、 0.1 M NaCl、pH 8.0) を加え縮合反応を停止した。

得られた各サンプル $300 \mu\text{l}$ にフィブリノーゲン溶液 (約 0.1%) 1 ml を加え、フィブリノーゲン凝固時間を室温にて測定した。

反応 0 分時のサンプルの凝固時間を 100% として、各サンプルの凝固活性を示すと、その活性は減少し、反応 60 分時以降、その活性はほぼ喪失した。結果を第 5 A 図に示す。

(iii): エチレンジアミン修飾トロンビンのアミノ基の定量

上記(i)の反応 0 分時、1 分時、15 分時、30 分時、60 分時、90 分時、120 分時の試料に、少量の強アルカリ溶液を加え反応を停止し、 0.5 M NaCl - 50 mM NaOH 溶液にて十分に透析を行ない、非結合エチレンジアミンを除去した。

得られた各サンプル溶液に 0.1 M Na_2SO_3 を加え、次に TNBS (トリニトロベンゼンスルホン酸) 液を添加し、速やかに攪拌し、5 分後に亜硫酸イオンを含む溶液を加え反応を停止した。

420 nm での吸光度 (図 5 B における A_{420}) を測定し、各サンプ

ルのアミノ基の定量を行った。

結果を第5B図に示す。縮合反応の経過時間と共に吸光度が増加し、トロンビンの表面へのエチレンジアミンの縮合反応量の増加が示された。なお、トロンビンの表面にはジカルボン酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸が存在するため、上記処理(i)により該カルボキシル基にエチレンジアミンのアミノ基が縮合する。また、エチレンジアミンはアミノ基を2個有するため、縮合反応に使用されないアミノ基がTNBSと反応し420nmの吸収によって定量される。

実施例9の結果から、カルボジイミドを用いたトロンビンのカルボキシル基への修飾反応は経過時間と共に進行した。このことは、トロンビンに含まれる複数のカルボキシル基に対するカルボジイミドによる修飾が時間の経過と共に進行し、反応時間が長いほどトロンビンにおけるカルボジイミドの修飾率を増加させ得ることが判明した。そして、該エチレンジアミン修飾トロンビンによるフィブリノーゲンに対する凝固活性は、反応60分時のエチレンジアミン修飾トロンビンによって完全に消失していた。

一方、フィブリノーゲンに対する凝固活性は、反応1分時から急激に低下しており、対応するアミノ酸の定量値と対比すると、トロンビンの一部にカルボジイミドによる修飾が行われた場合でも有効にフィブリノーゲンに対する凝固活性の低下効果が得られることが判明した。

実施例10

人トロンビン4mgを50mM ビセスバッファー、0.1M NaCl、pH6.5 4mlに溶解し100mgEDCを添加し3時間反応し、トロンビン誘導体としてEDC修飾トロンビンを得た。血小板
5 数40万/ μ lに調整した人多血小板血漿(PRP)を用い上記物質を惹起物質として血小板凝集を測定した。凝集は吸光度の低下をモニター

した（凝集メータアグリテックTE-500使用）。PRPに対して惹起物質としてのEDC修飾トロンビンを、それぞれ、91.3 nM、36.5 nM、30.1 nM、24.2 nM、20.1 nM、10.1 nMの濃度になるように、添加した。比較としてEDC修飾トロンビンを加えないもの（添加濃度：0 nM）を用いた。

第6図は、各濃度のEDC修飾トロンビン添加後の血小板凝集の変化（吸光度の変化）を示すグラフである。第6図から、EDC修飾トロンビンの添加濃度が多いほど、吸光度は急激に立ち上がり、即ち、迅速に血小板を凝集させることが分かり、ゆえに、EDC修飾トロンビンは、濃度に依存して血小板を惹起することが分かった。

これから、本発明のトロンビン誘導体は、血小板凝集惹起物質として、さらには、臨床検査薬、特に血小板の正常性をモニターするための検査薬として有用であると考えられる。

実施例11

本実施例では、エチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビンの基質親和性を以下のようにして評価した。

実施例2で得られたアンヒドロトロンビンを、1 mM ピペスバッファ、0.5 M NaCl、pH 6.5にて透析し、得られたアンヒドロトロンビン含有溶液（0.6 mg/ml）に同量のエチレンジアミンを含む溶液（1 Mエチレンジアミン、1 mM PIPES、0.5 M NaCl、pH 6.5）を混合した。次いで、これに最終濃度20 mg/mlとなるようEDCを添加し、EDCの添加から、2時間にわたり、室温で攪拌し、縮合反応を行わせた。反応後、修飾アンヒドロトロンビンを0.5 M 炭酸水素ナトリウム、0.5 M NaCl溶液（4℃）に対して2回透析して、エチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビンを得た。

このようにして得られたエチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビン及び比較としてのアンヒドロトロンビンについて、フィブリノーゲン (F b g n)、血液凝固第 VIII 因子 (F V I I I) 及び血液凝固第 V 因子 (F V) との間の解離定数 (K d 値) を I A s y s (日製産業) を用いて測定した。結果を表 3 に示す。

表 3

	FVIII	Fbgn	FV
エチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビン	9×10^{-9}	3.1×10^{-6}	2×10^{-6}
アンヒドロトロンビン	1.4×10^{-8}	1.8×10^{-8}	8.5×10^{-8}

上記表 3 に示されるように、エチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビンは、血液凝固第 VIII 因子 (F V I I I) に対しては高い親和性を保っていたが、フィブリノーゲン (F b g n) 及び血液凝固第 V 因子 (F V) に対しては親和性が F V I I I に対する親和性に比して数百分の 1 程度と有意に低下した。これから、本発明のアンヒドロトロンビン誘導体であるエチレンジアミン修飾アンヒドロトロンビンは、血液凝固第 VIII 因子に対して特異的に結合することが示唆される。

産業上の利用可能性

本発明のトロンビン誘導体はフィブリノーゲンに対する親和性が低下しているため、血小板凝集惹起組成物として、さらには臨床検査用などに特異的な凝固反応試薬として利用できる。また、アンヒドロトロンビンをリガンドとし、カルボキシル基と結合させたアフィニティークロマトグラフィーにより、血液凝固第 VIII 因子に対してより選択性の高い

精製が可能となり、また、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾したアンヒドロトロンビン誘導体は、従来のアンヒドロトロンビンに比べ少量で十分な抗血栓効果を生じるため、血栓形成抑制剤として利用できる。

請 求 の 範 囲

1. トロンビンのカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体。
2. 該カルボキシル基の修飾はイミドを用いて行われる請求項1記載のトロンビン誘導体。
3. 該イミドはカルボジイミド誘導体である請求項2記載のトロンビン誘導体。
4. 該カルボジイミド誘導体はN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド {N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride} およびN-シクロヘキシル-N'-2-(4'-メチル-モルフォリニウム)エチルカルボジイミド-p-トルエンスルフォネート {N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpholinium)ethyl carbodiimide-p-toluene sulphonate} からなる群より選ばれる1種以上である請求項3記載のトロンビン誘導体。
5. 該カルボキシル基の修飾はアミノ基を有する物質を用いて行われる請求項1~4のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体。
6. アンヒドロトロンビンのカルボキシル基が修飾されたアンヒドロトロンビン誘導体。
7. 該カルボキシル基の修飾はイミドを用いて行われる請求項6記載のアンヒドロトロンビン誘導体。
8. 該イミドはカルボジイミド誘導体である請求項7記載のアンヒドロトロンビン誘導体。
9. 該カルボジイミド誘導体はN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド {N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride} およびN-シクロヘキシル-N'-2-(4'-メチル-モルフォリニウム)エチルカル

ボジイミド-p-トルエンスルフォネート) {N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpolinium)ethyl carbodiimide-p-toluene sulphonate} からなる群より選ばれる1種以上である、請求項8記載のアンヒドロトロンビン誘導体。

10. 該カルボキシル基の修飾はアミノ基を有する物質を用いて行われる請求項6～9のいずれか1項に記載のアンヒドロトロンビン誘導体。

11. トロンビンのカルボキシル基を修飾することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体の製造方法。

12. カルボキシル基の修飾がイミドを用いて行うことを特徴とする請求項11記載のトロンビン誘導体の製造方法。

13. 該イミドはカルボジイミド誘導体であることを特徴とする請求項12記載のトロンビン誘導体の製造方法。

14. 該カルボジイミド誘導体はN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド {N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride} およびN-シクロヘキシル-N'-2-(4'-メチル-モルフォリニウム)エチルカルボジイミド-p-トルエンスルフォネート {N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpolinium)ethyl carbodiimide-p-toluene sulphonate} からなる群より選ばれる1種以上であることを特徴とする請求項13記載のトロンビン誘導体の製造方法。

15. カルボキシル基の修飾がアミノ基を有する物質を用いて行うことを特徴とする請求項11～14のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体の製造方法。

16. アンヒドロトロンビンのカルボキシル基を修飾することを特徴とする請求項6～10のいずれか1項に記載のアンヒドロトロンビン

誘導体の製造方法。

17. カルボキシル基の修飾がイミドを用いて行うことを特徴とする請求項16記載のアンヒドロトロンビン誘導体の製造方法。

18. 該イミドはカルボジイミド誘導体であることを特徴とする請求項17記載のアンヒドロトロンビン誘導体の製造方法。

19. 該カルボジイミド誘導体はN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド {N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride} およびN-シクロヘキシル-N'-2-(4'-メチル-モルフォリニウム)エチルカルボジイミド-p-トルエンスルフォネート {N-cyclohexyl-N'-2-(4'-methyl-morpholinium)ethyl carbodiimide-p-toluene sulphonate} からなる群より選ばれる1種以上であることを特徴とする請求項18記載のアンヒドロトロンビン誘導体の製造方法。

20. カルボキシル基の修飾がアミノ基を有する物質を用いて行うことを特徴とする請求項16～19のいずれか1項に記載のアンヒドロトロンビン誘導体の製造方法。

21. 請求項1～5のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体を成分とする血小板凝集惹起組成物。

22. 請求項1～5のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体を用いることを特徴とする血小板凝集惹起方法。

23. 請求項1～5のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体を含有することを特徴とする臨床検査薬。

24. 請求項1～5のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体を用いることを特徴とする臨床検査方法。

25. 請求項6～10のいずれか1項に記載のアンヒドロトロンビン誘導体を含有する血栓形成抑制剤。

26. アンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体であって、該結合が、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基と不溶性担体の官能基との反応によるものである吸着体。

27. アミノ基を2以上有する化合物のアミノ基とアンヒドロトロンビンのカルボキシル基との結合によってアミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンと、水不溶性担体とが結合してなる吸着体であって、該結合が、該アミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンが含有するアミノ基と不溶性担体の官能基との反応によるものである吸着体。

28. 該アミノ基を2以上有する化合物はエチレンジアミンである請求項27記載の吸着体。

29. アンヒドロトロンビンのカルボキシル基と不溶性担体の官能基とを反応させることを特徴とするアンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体の製造方法。

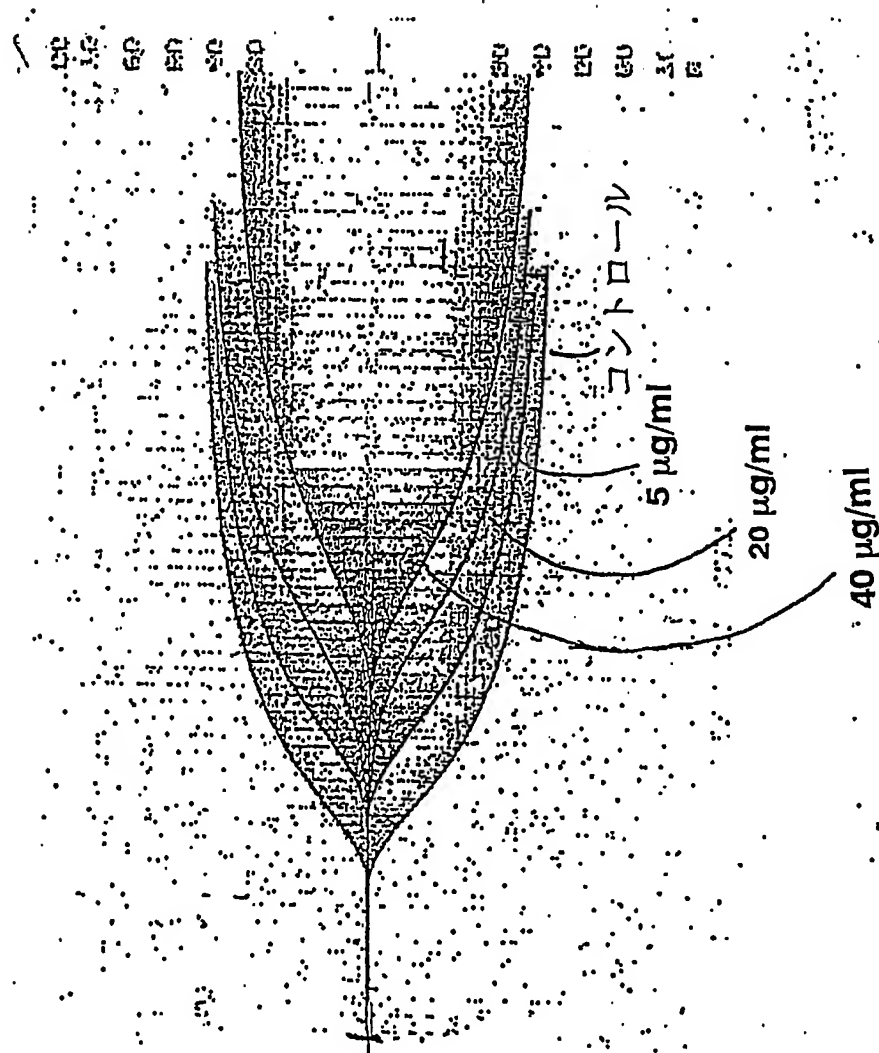
30. アミノ基を2以上含有する化合物のアミノ基とアンヒドロトロンビンのカルボキシル基との結合によってアミノ基が導入されたアンヒドロトロンビンが有するアミノ基と、不溶性担体の官能基とを反応させることを特徴とするアンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体の製造方法。

31. アミノ基を2以上含有する化合物がエチレンジアミンであることを特徴とする請求項29記載のアンヒドロトロンビンと水不溶性担体とが結合してなる吸着体の製造方法。

32. 請求項26～28の何れか1項記載の吸着体を用いることを特徴とする精製された血液凝固第VIII因子の製造方法。

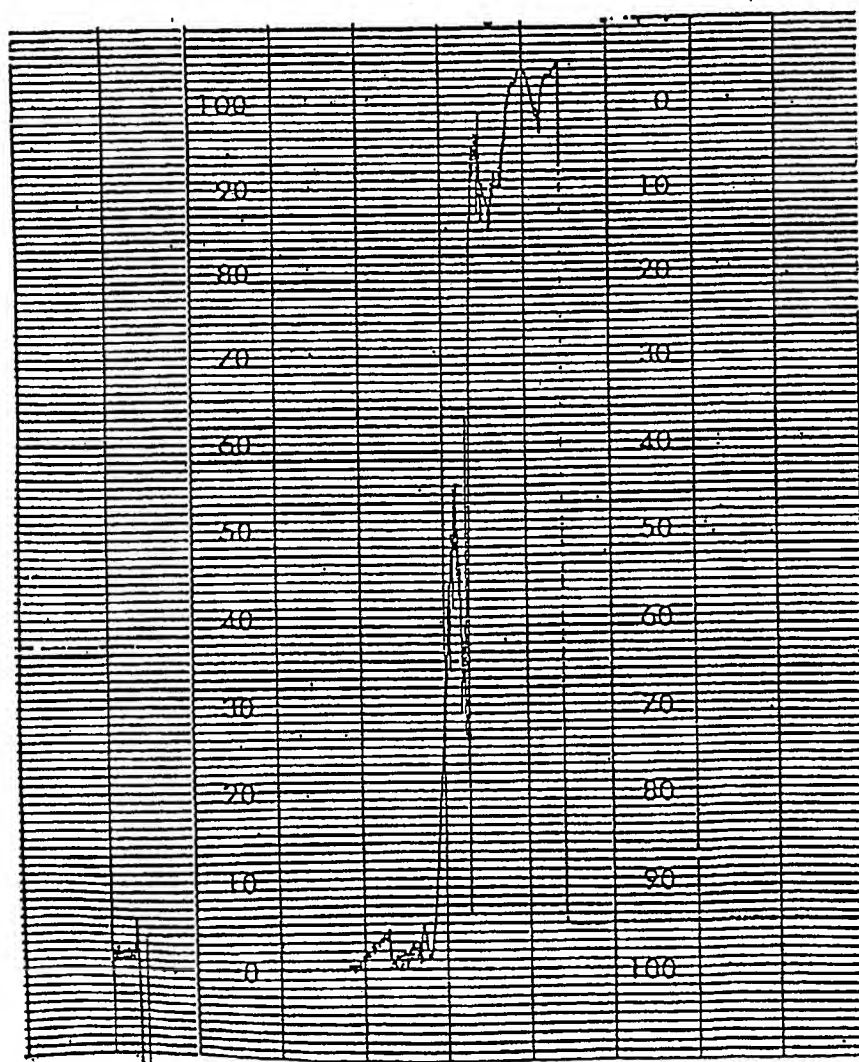
1/6

第1図



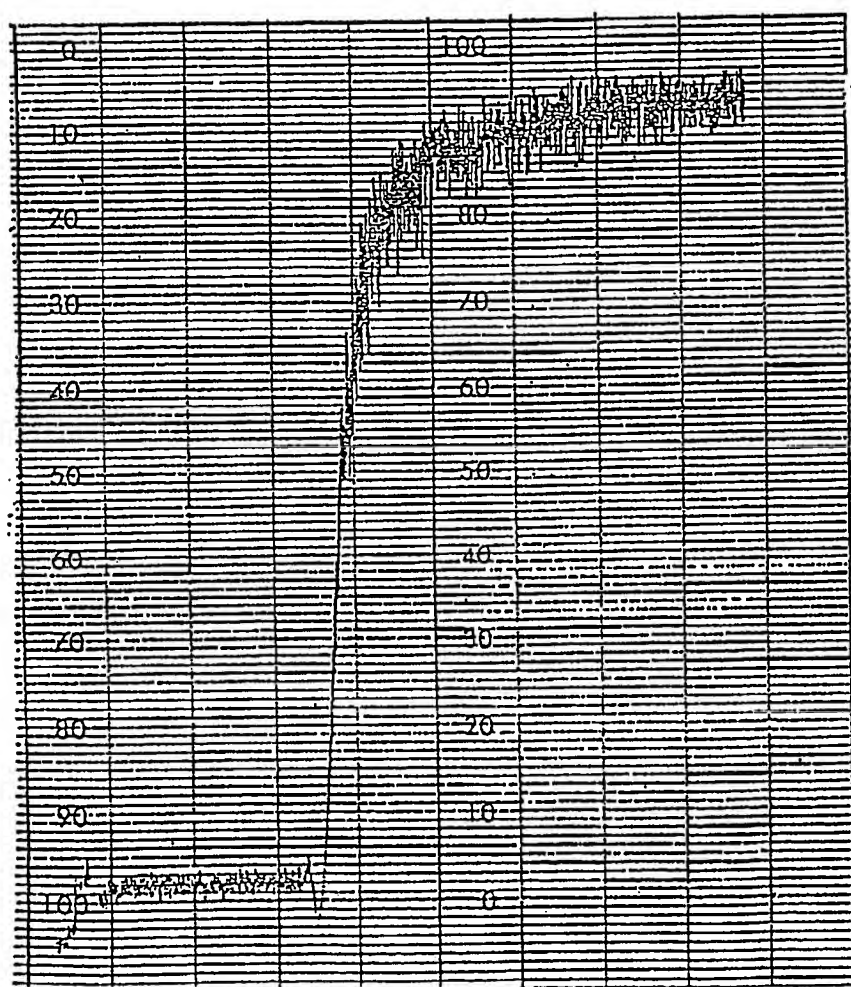
2/6

第2図



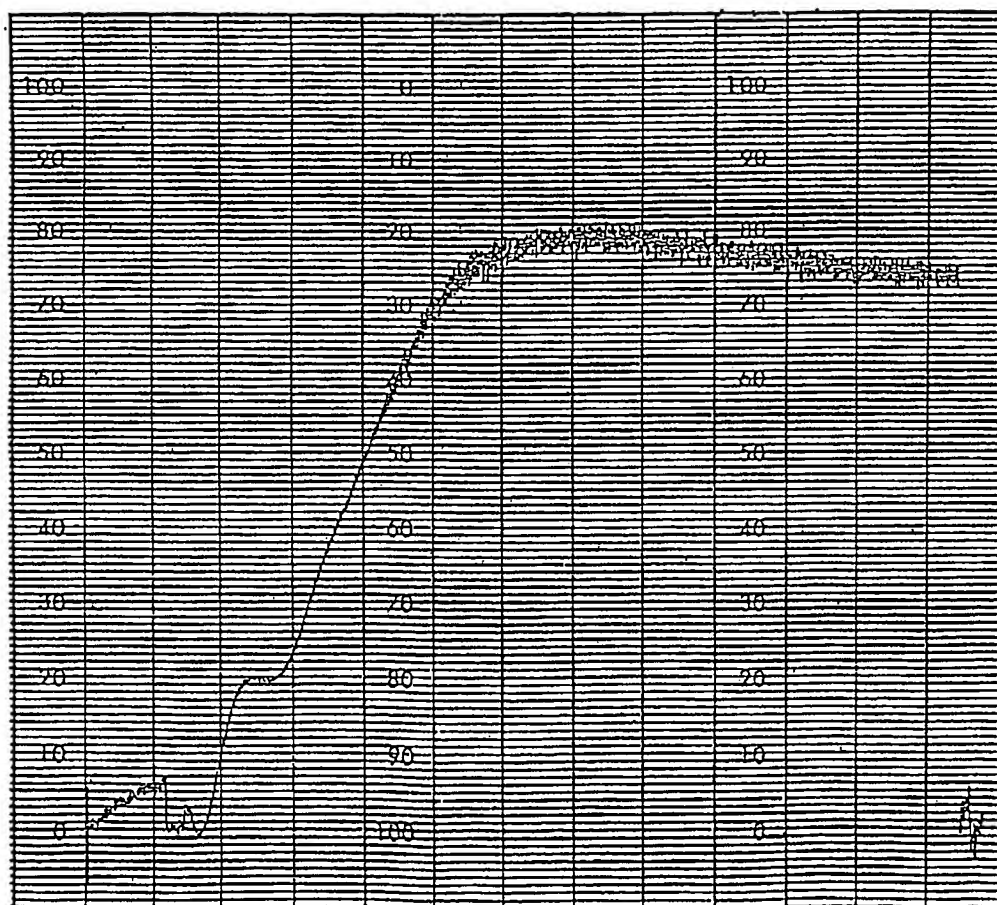
3/6

第 3 図



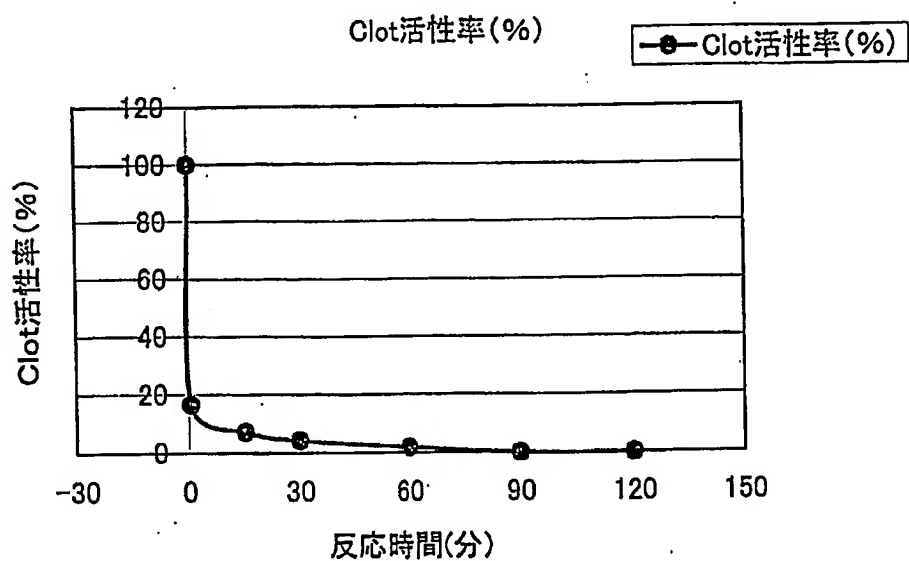
4/6

第 4 図

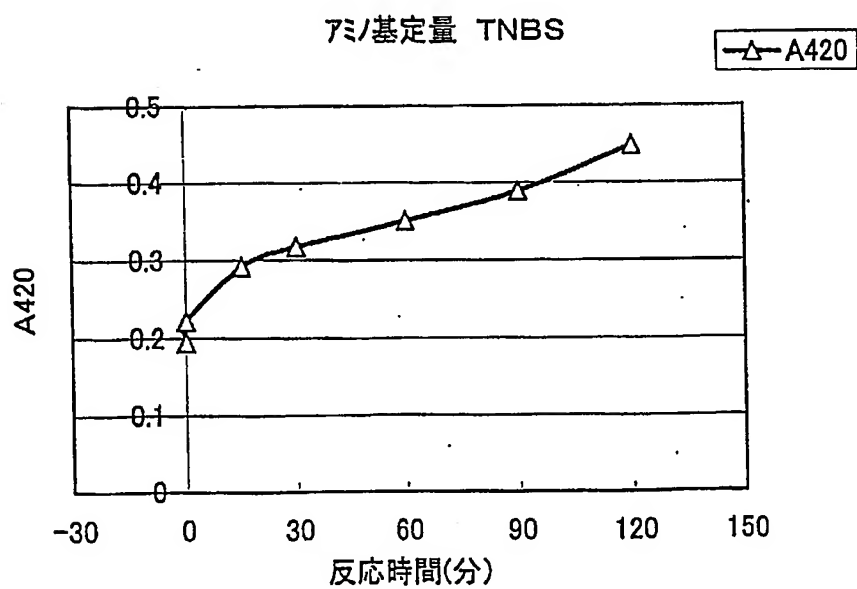


5/6

第 5A 図



第 5B 図



6/6

第6図

